

⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 40 19 166 A 1

⑳ Aktenzeichen: P 40 19 166.4
㉑ Anmeldetag: 15. 6. 90
㉒ Offenlegungstag: 19. 12. 91

⑤ Int. Cl.⁶:
C12P 7/44
C 07 C 59/305
// (C12P 7/44, C12R
1:72, 1:73, 1:74,
1:85) B01F 17/56,
17/34, C08G 63/672,
69/40, C10M 105/26

DE 40 19 166 A 1

㉓ Anmelder:
Henkel KGaA, 4000 Düsseldorf, DE

㉔ Erfinder:
Schindler, Joachim, Dr.; Meussdörffer, Franz, Dr.,
4010 Hilden, DE; Stoll, Gerhard, Dr., 4052
Korschenbroich, DE; Eierdanz, Horst, Dr., 4010
Hilden, DE; Waldhoff, Heinrich, Dr., 4018
Langenfeld, DE

⑤④ Verfahren zur Herstellung von Etherdicarbonsäuren

⑤⑦ Ein Verfahren zur Umwandlung von substituierten Alkanen in Dicarbonsäuren mit zumindest vorwiegend gleicher Anzahl an C-Atomen in Gegenwart von Hefemutanten, deren β -Oxidationsweg unterbrochen ist, sollte so abgewandelt werden, daß Etherdicarbonsäuren entstehen. Dies gelang dadurch, daß man Dialkylether mit mehr als einem C-Atom in jedem Alkylrest und insgesamt mindestens 10 C-Atomen einsetzt und dadurch in Etherdicarbonsäuren umwandelt.

DE 40 19 166 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Etherdicarbonsäuren.

Dicarbonsäuren mit mehr als 10 C-Atomen sind nach Methoden der präparativen organischen Chemie im technischen Maßstab schwer herstellbar. Insbesondere gilt dies auch für langkettige Etherdicarbonsäuren.

Man hat daher versucht, aus gut zugänglichen Rohstoffen mit Hilfe der Stoffwechselleistungen verschiedener Mikroorganismen Dicarbonsäuren präparativ zu erzeugen. So wird in der deutschen Patentschrift 21 40 133 vorgeschlagen, auf Alkane, primäre Alkanole oder Carbonsäuren eine Hefe der Gattung *Candida* oder *Pichia* unter Fermentationsbedingungen einwirken zu lassen. Bei Einsatz von zum Beispiel einem speziellen Stamm von *Candida lipolytica* entstehen dabei Dicarbonsäuren, deren C-Kette gegenüber dem Ausgangsmaterial nicht oder nicht wesentlich abgebaut ist und auch ansonsten keine Veränderungen wie Einführen neuer funktioneller Gruppen aufweist. Ähnliche Verfahren, bei denen spezielle andere Mikroorganismen eingesetzt werden, sind beschrieben in den US-Patenten 39 75 234 und 43 39 536; in der britischen Patentschrift 14 05 026 sowie in den deutschen Offenlegungsschriften 21 64 626, 28 53 847, 29 37 292 und 29 51 177.

Das US-Patent 44 74 882 hat ungesättigte Dicarbonsäuren zum Gegenstand. Diese werden gewonnen, indem ein Stamm der Spezies *Candida tropicalis* zur Umwandlung von ungesättigten Monocarbonsäuren mit 14 bis 22 C-Atomen eingesetzt wird. Die ungesättigten Dicarbonsäuren entsprechen in Anzahl und Lage der Doppelbindung den Ausgangsmaterialien.

In der deutschen Offenlegungsschrift DE 35 40 834 wird ein Verfahren zur Umwandlung von Alkanen und/oder Monocarbonsäuren in Dicarbonsäuren angegeben, bei dem mit einer Blockmutante von *Candida lipolytica* gearbeitet wird, wobei Dicarbonsäuren entstehen, die zusätzliche Doppelbindungen aufweisen.

Ein Verfahren, bei dem keine zusätzlichen Doppelbindungen eingefügt werden, wird in der deutschen Offenlegungsschrift DE 37 21 119 beschrieben, die einen Mikroorganismenstamm *Candida tropicalis* betrifft, der Fähigkeit aufweist, insbesondere Methylmyristat in Tetradeccandisäure umzuwandeln.

Schließlich beschreibt die deutsche Offenlegungsschrift DE 37 38 812 einen Stamm *Candida tropicalis*, der die Fähigkeit besitzt, kettenlängenspezifisch Methylaurat in die entsprechende Dicarbonsäure umzusetzen.

Eine Literaturübersicht über das Gesamtgebiet findet sich bei H.J. Rehm und G. Reed (Herausgeber), *Biotechnology*, Vol. 6a, Kapitel 9, Seiten 329 ff., Verlag Chemie Weinheim 1984).

Aus der genannten Vorliteratur ist es aber noch nicht bekannt, daß außer Alkanen und deren Derivaten auch langkettige Ether eingesetzt und in Etherdicarbonsäuren umgewandelt werden können. Hier hätte der Fachmann vermutet, daß das Vorhandensein der Ethergruppe zu nicht gewünschten Reaktionen unter Kettenabbau führen könnte.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung ein Verfahren bereitzustellen, daß es erlaubt, aus langkettigen Ethern Etherdicarbonsäuren herzustellen, da insbesondere langkettige Etherdicarbonsäuren auf klassisch chemischen Wege schlecht darstellbar sind.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Umwandlung von Alkanen in Dicarbonsäuren mit zu-

mindest vorwiegend gleicher Anzahl an C-Atomen in Gegenwart von Hefemutanten, deren β -Oxidationsweg unterbrochen ist, dadurch gekennzeichnet, daß man Dialkylether mit mehr als einem C-Atom in jedem Alkylrest und insgesamt mindestens 10 C-Atomen in Etherdicarbonsäuren umwandelt.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren können eine Vielzahl von langkettigen Dialkylethern eingesetzt werden. Voraussetzung ist, daß jede Alkylgruppe mehr als 1 und vorzugsweise auch mehr als 4 C-Atome enthält. Geeignet sind sowohl symmetrische als auch unsymmetrische verzweigte wie lineare Ether. Bevorzugt sind lineare symmetrische Dialkylether mit 5 bis 22 C-Atomen in jeder Alkylgruppe. Derartige Ether können beispielsweise durch Säure-katalysierte Veretherung von Fettalkoholen oder durch Umsetzung von Fettalkoholen mit Fettalkoholsulfaten bzw. den analogen Alkylhalogeniden hergestellt werden.

Unter Dialkylethern im erfindungsgemäßen Sinne werden ganz allgemein auch Verbindungen der allgemeinen Formel,

$R^1-O-((CH_2)_n-O)_m-R^2$,
verstanden, wobei in dieser Formel die Reste R^1 und R^2 Alkylgruppen mit 5 bis 22 C-Atomen bedeuten, $n =$ für eine Zahl von 2 bis 6 steht und $m =$ 0 bis 100 bedeutet. So können beispielsweise Ethoxylate primärer Alkohole, deren End-OH-Gruppe mit einer weiteren bestimmungsgemäßen Alkylgruppe verethert ist, eingesetzt werden.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann der Fachmann auf Hefemutanten, bei denen der β -Oxidationsweg durch klassische Mutagenese oder genetische Manipulation unterbrochen ist, zurückgreifen. So sind prinzipiell eine Vielzahl von Mutanten von Stämmen einsetzbar, die den Familien *Candida*, *Pichia* oder *Saccharomyces* angehören.

Mit besonderem Vorteil können Mutanten von Stämmen *Candida lipolytica* oder *Candida tropicalis* eingesetzt werden. So kann beispielsweise der in der DE 35 40 834 genannte Stamm DSM 3581 oder der in der DE 37 38 812 genannte Stamm DSM 4277 bzw. Mutanten oder Varianten dieser Stämme mit Erfolg bevorzugt eingesetzt werden.

Das zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzte Fermentationsmedium entspricht den für die Anzucht von *Candida*-Arten bekannten und beschriebenen Medien. Geeignete Fermentationsmedien enthalten die üblichen Spurenelemente, eine Stickstoffquelle und eine zusätzliche, dem zu transformierenden Substrat nicht identische Kohlenstoffquelle. Unter Spurenelementen sind hier beispielsweise Salze der Kationen, Ammonium, Kalium, Natrium, Magnesium, Calcium und Mangan mit den Anionen wie Phosphat, Sulfat, Chlorid zu verstehen. Als Stickstoffquelle können neben anorganischen Verbindungen wie zum Beispiel $(NH_4)_2SO_4$ auch Pepton oder Hefeextrakt eingesetzt werden.

Die Fermentationslösung enthält weiterhin als Kohlenstoffquelle ein Cosubstrat. Als Cosubstrat kann beispielsweise Natriumacetat eingesetzt werden. Weiterhin ist es möglich, daß als Cosubstrat übliche Zucker wie Glucose, Fructose, Maltose, Trehalose und dergleichen eingesetzt werden. Ein besonders bevorzugtes Cosubstrat ist Glycerin.

Nach einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es bevorzugt, den zur Umwandlung vorgesehenen Ausgangsverbindungen zur besseren Verteilung im Fermentationsmedium

Emulgatoren zuzufügen. So werden günstige Ergebnisse erzielt, wenn insgesamt 0,1 bis 3 Gew.-%, bezogen auf Fermentationsmedium, an Emulgatoren vorhanden sind. Geeignet sind hier physiologisch verträgliche Emulgatoren und insbesondere physiologisch verträgliche nichtionische Emulgatoren. So können beispielsweise Zuckerester oder auch Sorbitanester, ethoxylierte Zuckerester, ethoxylierte Sorbitanester oder auch Alkylglycoside eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäß hergestellten Etherdicarbonsäuren können als Ausgangsstoffe für die Herstellung von Polyestern, Polyamiden oder auf dem Schmiermittelsektor Verwendung finden.

Beispiel

Medium A: "Yeast-Nitrogen-Base" Medium (Fa. Difco) pH 6,8, supplementiert mit 1,3% Glucose, 4,5% Glycerin, 0,3% Na-Acetat, 0,3% Pepton und 0,6% Hefeextrakt sowie 0,5% Transformationsedukt.

Medium B: 0,2M Phosphatpuffer, pH 7,8 mit "Yeast nitrogen base w/o aminoacids" (Difco), 0,3% ethoxylierter Sorbitanester, MYRJ52® und 3% Substrat.

Candida tropicalis: DSM 4131 wurde in 100 ml YM-Nährbouillon (Fa. Difco, 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen) angeimpft und für 36 h bei 140 UpM geschüttelt. Aus dieser Vorkultur wurde ein Aliquot (10 ml) zur Beimpfung von 500 ml Medium A im 2 l Erlenmeyerkolben verwendet. Diese Kultur wurde 48 h bei 30°C geschüttelt (140 UpM) und anschließend in 100 ml Aliquots steril abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 ml Medium B (500 ml Erlenmeyerkolben) resuspendiert, wobei Di-n-octylether als Substrat diente. Nach jeweils 24 h wurde der pH des Ansatzes überprüft, bei Bedarf nachgestellt und der Fortgang der Transformation durch TLC mit anschließender Anfärbung auf Carboxylgruppen überprüft. Das Auftreten positiver Banden nach Anfärbung mit Eisenchlorid zeigte die Bildung von Carbonsäuren an. Nach 60, 80 und 168 h wurden Essigsterextrakte von Aliquots des Ansatzes mittels HPLC auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Neugebildete Verbindungen wurden nach der Auftrennung und Derivatisierung mittels GCMS charakterisiert. So konnte nachgewiesen werden, daß sich nach 168 h 1,0 g/l Etherdicarbonsäure gebildet hatten.

einer Mutante von *Candida lipolytica* oder *Candida tropicalis* arbeitet.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Umwandlung von substituierten Alkanen in Dicarbonsäuren mit zumindest vorwiegend gleicher Anzahl an C-Atomen in Gegenwart von Hefemutanten, deren β -Oxidationsweg unterbrochen ist, dadurch gekennzeichnet, daß man Dialkylether mit mehr als einem C-Atom in jedem Alkylrest und insgesamt mindestens 10 C-Atomen in Etherdicarbonsäuren umwandelt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man symmetrische Dialkylether mit 5 bis 22 C-Atomen in jedem Alkylrest einsetzt.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man in Gegenwart einer Mutante eines Stammes aus der Familie *Candida pichia* oder *Saccharomyces* arbeitet, bei welcher der β -Oxidationsweg durch klassische Mutagenese oder durch gentechnische Manipulation unterbrochen ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man in Gegenwart

— Leerseite —

TRANSLATION

(19) Federal Republic of Germany
German Patent Office

(12) Preliminary Published Application (10) DE 40 19 166 A1

(51) International Classification⁵: C 12 P 7/44; C 07 C 59/305; //(C12P 7/44, C12R 1:72, 1:73, 1:74, 1:85) B01F 17/56, 17/34, C08G 63/672, 69/40, C10M 105/26

(21) File number: P 40 19 166.4

(22) Date of application: 15 June 1990

(43) Date of publication: 19 December 1991

(71) Applicant:
Henkel KGaA, Dusseldorf

(72) Inventors:
Dr. Joachim Schindler, Dr. Franz Meussdorffer, Dr. Gerhard Stoll,
Dr. Horst Eierdanz and Dr. Heinrich Waldhoff

(54) Title:
PROCESS FOR PRODUCTION OF ETHER DICARBOXYLIC ACIDS

(57) ABSTRACT:

A process for transforming substituted alkanes into dicarboxylic acids with at least predominantly the same number of C atoms in the presence of yeast mutants whose β -oxidation pathway is interrupted is said to have been modified in such a way that ether dicarboxylic acids are formed. This was possible due to the fact that dialkyl ethers with more than one C atom in each alkyl radical and a total of at least 10 C atoms are used and thereby transformed into ether dicarboxylic acids.

Description

The invention concerns a process for the production of ether dicarboxylic acids.

Dicarboxylic acids with more than 10 C atoms are difficult to synthesize by methods of preparative organic chemistry on an industrial scale. In particular this is also true for long-chained ether dicarboxylic acids.

Therefore it has been attempted to produce dicarboxylic acids by preparative techniques from readily available raw materials with the aid of metabolic functions of various microorganisms. Thus in German patent 21 40 133 it is proposed that a yeast of the genus *Candida* or *Pichia* be allowed to act under conditions of fermentation on alkanes, primary alkanols or carboxylic acids. For example, in the case when a special strain of *Candida lipolytica* is used dicarboxylic acids are formed whose C chain is not or not significantly degraded relative to the initial material and also otherwise displays no changes such as introduction of new functional groups. Similar processes in which other special microorganisms are used are described in US patents 39 75 234 and 43 39 536; in British patent 14 05 026 and in the German preliminary published applications 21 64 626, 28 53 847, 29 37 292 and 29 51 177.

The US patent 44 74 882 has unsaturated dicarboxylic acids as its subject. The latter are obtained by using a strain of the species *Candida tropicalis* for transforming unsaturated monocarboxylic acids with 14 to 22 C atoms. The unsaturated dicarboxylic acids conform in number and position of the double bond to the initial materials.

In the German preliminary published application DE 35 40 834 a process is reported for transforming alkanes and/or monocarboxylic acids into dicarboxylic acids in which one works with a block mutant of *Candida lipolytica*, obtaining dicarboxylic acids which display additional double bonds.

A process in which no additional double bonds are introduced is described in the German preliminary published application DE 37 21 119 which concerns a strain of the microorganism

Candida tropicalis which has the ability to transform, in particular, methyl myristate into tetradecanedioic acid.

Finally German preliminary published application DE 37 38 812 describes a strain of *Candida tropicalis* which has the ability to transform chain-length-specifically methyl laureate into the corresponding dicarboxylic acid.

A review of the literature covering the entire field is found in H.J. Rehm and G. Reed (publishers), Biotechnology, Volume 6a, Chapter 9, pages 329 ff, Verlag Chemie, Weinheim 1984).

From the preexisting literature cited above, however, it is not known that besides alkanes and their derivatives also long chained ethers can be used and be transformed into ether dicarboxylic acids. Here the man of the art would conjecture that the presence of the ether group could lead to undesired reactions with chain degradation.

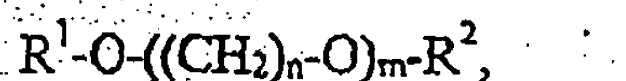
It is therefore the purpose of the present invention to devise a process which permits the synthesis of ether dicarboxylic acids from long-chained ethers since, in particular, long-chained ether dicarboxylic acids are difficult to synthesize by classical chemical methods.

The subject of the invention is therefore a process for transforming alkanes into dicarboxylic acids with at least predominantly the same number of C atoms in the presence of yeast mutants whose β -oxidation pathway is interrupted, characterized by the fact that dialkyl ethers with more than 1 C atom in each alkyl radical and at least 10 C atoms are transformed into ether dicarboxylic acids.

According to the process of the invention a large number of long chained dialkyl ethers may be used. The precondition is that each alkyl group must have more than 1 and preferably also more than 4 C atoms. Both symmetrical and asymmetrical branched and linear ethers are suitable. Linear symmetrical dialkyl ethers with 5 to 22 C atoms in each alkyl group are preferred. Such ethers, for example, can be synthesized by acid-catalyzed etherification of fatty

alcohols or by reaction of fatty alcohols with fatty alcohol sulfates or the analogous alkyl halides.

The term 'dialkyl ethers' in the sense of the invention refers quite generally of compounds of the general formula



in this formula the radicals R^1 and R^2 denote alkyl groups with 5 to 22 C atoms, n stands for a number from 2 to 6 and m equals 0 to 100. Thus, for example, ethoxylates of primary alcohols whose end-OH group is etherified with another specific alkyl group may be used.

To carry out the process of the invention the man of the art may resort to yeast mutants in which the β -oxidation pathway has been interrupted by classical mutagenesis or genetic manipulation. Thus basically a large number of mutants of strains may be used which belong to the families [sic, for genera] *Candida*, *Pichia* or *Saccharomyces*.

Mutants of the strains of *Candida lipolytica* or *Candida tropicalis* may be used with particular advantage, thus for example the strain DSM 3581 mentioned in DE 35 40 834 or the strain DSM 4277 mentioned in DE 37 38 812 or mutants or variants of these strains can be successfully, and are preferably, used.

The fermentation medium used to carry out the process according to the invention corresponds to the media described for cultivation of *Candida* varieties. Suitable fermentation media contain the usual trace elements, a nitrogen source and an additional carbon source not identical to the substrate to be transformed. The term 'trace elements' here refers for example to the salts of the cations, ammonium, potassium, sodium, magnesium, calcium and manganese with anions such as phosphate, sulfate, and chloride. As the nitrogen source, besides inorganic compounds, such as $(NH_4)_2SO_4$ peptone or yeast extract may also be used.

The fermentation solution also contains a co-substrate as the carbon source. As a co-substrate for example, one may use sodium acetate. It is also possible to use ordinary sugars as a co-substrate such as glucose, fructose, maltose, trehalose and the like. Glycerin is an especially

preferred co-substrate.

According to another embodiment of the process of the invention it is preferred to add emulsifiers to the initial compounds intended for transformation for better distribution in the fermentation medium. Thus, favorable results are achieved if a total of 0.1-3 wt.%, relative to the fermentation medium, of emulsifiers are present. Suitable here are physiologically compatible emulsifiers and especially physiologically compatible nonionic emulsifiers. Thus, for example, sugar esters or also sorbitan esters, ethoxylated sugar esters, ethoxylated sorbitan esters or also alkyl glycosides may be used.

The ether dicarboxylic acids produced according to the invention may be used as initial materials for the production of polyesters, polyamides or in the lubricant sector.

Example

Medium A: "yeast nitrogen base" Medium (by Difco) pH 6.8, supplemented with 1.3% glucose, 4.5% glycerin, 0.3% Na acetate, 0.3% peptone and 0.6% yeast extract and 0.5% transformation educt.

Medium B: 0.2 M phosphate buffer, pH 7.8 with "yeast nitrogen base w/o amino acids" (Difco), 0.3% ethoxylated sorbitan ester, MYRJ52[®] and 3% substrate.

Candida tropicalis DSM 4131 was inoculated in 100 ml of YM nutrient bouillon (Difco, 500 ml Erlenmeyer flasks with baffles) and shaken for 36 h at 140 rpm. From this pre-culture an aliquot (10 ml) was used for inoculating 500 ml of medium A in the 2 liter Erlenmeyer flask. This culture was shaken for 48 h at 30°C (140 rpm) and then centrifuged off sterile in 100 ml aliquots. The cells were suspended in 100 ml of medium B (500 ml Erlenmeyer flask), di-n-octyl ether serving as the substrate. After 24 h in each case the pH of the batch was checked, adjusted if necessary, and the progress of the transformation was monitored by TLC with subsequent staining for carboxyl groups. The appearance of positive bands of staining with iron chloride indicated the formation of carboxylic acids. After 60, 80 and 168 h acetic ester extracts from

aliquots of the batch were studied by HPLC for composition. Newly formed compounds were characterized by GCMS after separation and derivatization. In this way it could be shown that after 168 h 1.0 g/l of ether dicarboxylic acid had formed.

Claims

1. Process for transforming substituted alkanes into dicarboxylic acids with at least predominantly the same number of C atoms in the presence of yeast mutants whose β -oxidation pathway is interrupted, characterized by the fact dialkyl ethers with more than 1 C atom in each alkyl radical and a total of at least 10 C atoms are transformed into ether dicarboxylic acids.
2. Process as in claim 1 characterized by the fact that symmetrical dialkyl ethers with 5 to 22 C atoms in each alkyl radical are used.
3. Process as in one of claims 1 and 2 characterized by the fact that one works in the presence of a mutant of a strain of the genera *Candida*, *Pichia* or *Saccharomyces* in which the β -oxidation pathway is interrupted by classical mutagenesis or by genetic engineering manipulation.
4. Process as in one of claims 1-3 characterized by the fact that one works in the presence of a mutant of *Candida lipolytica* or *Candida tropicalis*.